



جداسازی و بررسی توالی ژن هماگلوتینین ویروس انفلوانزای A/H1N1 عامل پاندمی ۲۰۰۹ (جدایه‌ی ایران)

سیده فهیمه موسوی^۱، فاطمه فتوحی^{۱*}، آتنا یوسفی^۱، بهرخ فرهمند^۱، بهناز حیدرچی^۱، رضوان توکلی^۱، معصومه توسطی خیری^۱

^۱ گروه ویروس‌شناسی، آزمایشگاه تحقیقات انفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران

(دریافت مقاله: ۹۱/۵/۲۵ - پذیرش مقاله: ۹۱/۷/۲۲)

چکیده

زمینه: ویروس انفلوانزا پاتوژن تنفسی مهمی است که سالانه منجر به درصد بالایی از بیماری و مرگ و میر می‌شود. ویروس جدید A/H1N1 (Novel) که در سال ۲۰۰۹ جمعیت زیادی از مردم جهان را درگیر کرد، از بازآرایی ژنوم سه نوع ویروس انفلوانزای انسانی، خوکی و پرندگان به وجود آمده است. با توجه به نقش مهم هماگلوتینین (HA) در عفونت‌زایی ویروس انفلوانزا، تعیین توالی ژنوم این پروتئین و بررسی تغییرات آن ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه ژن HA ویروس A/H1N1 Novel جدایه‌ی ایران جداسازی و بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، ژنوم ویروس از نمونه‌های مستقیم بیمار مبتلا به انفلوانزای Novel AH1N1 که با روش Real-timePCR و بر پایه پروتکل بین‌المللی در آزمایشگاه تحقیقات انفلوانزای انستیتو پاستور به تأیید رسیده بودند، استخراج شد و طول کامل ژنوم HA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به روش One step-RT-PCR تکثیر یافت. ژنوم تکثیر یافته بعد از کلونینگ در ناقل pGEM-T Easy، با آنالیز آنژیمی و تعیین توالی تأیید گردید.

یافته‌ها: طول کامل ژن بیان‌کننده پروتئین HA به کمک PCR از نمونه‌های بیمار جدا شد و پس از الکتروفورز و مشاهده قطعه مورد انتظار ۱۷۷۷ جفت بازی، استخراج از ژل صورت گرفته و سپس در ناقل pGEM-T Easy کلون و تعیین ترادف شد. توالی حاصله با استفاده از نرم‌افزار chromas و ویرایش ۱/۴۵ مورد بررسی قرار گرفت و نهایتاً با کد دستیابی "HQ ۴۱۹۰۰۱/۱" در بانک ژنی ثبت گردید. نتیجه‌گیری: نتایج آنالیز نوکلئوتیدی نشان داد که توالی فوق با تمام سکانس‌های گزارش شده از سراسر دنیا از جمله سویه توصیه شده برای واکسن مطابقت دارد.

واژگان کلیدی: انفلوانزا، هماگلوتینین، پاندمی ۲۰۰۹، توالی یابی، بانک ژن

* تهران، خیابان جمهوری، خیابان ۱۲ فروردین، شماره ۳۵۸، انستیتو پاستور ایران، کد پستی ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱

مقدمه

انفلوانزا بیماری ویروسی است که بخش‌های بالایی مجاری تنفسی را درگیر می‌کند. ویروس‌های این خانواده دارای پوشش لیپیدی بوده و ژنوم RNA تک رشته‌ای قطعه قطعه با پولاریته منفی دارند. ویروس‌های انفلوانزا بر اساس تفاوت‌های آنتی‌ژنی میان پروتئین‌های ماتریکس (M) و نوکلئوپروتئین (NP) به سه تیپ A، B و C طبقه‌بندی می‌گردند (۱).

ویروس تیپ A قادر به ایجاد عفونت در انسان، پرندگان و سایر پستانداران می‌باشد که بر اساس آنتی‌ژن‌های سطحی هم‌گلوتینین (HA) و نورامینیداز (NA) به زیر تیپ‌هایی (subtype) تقسیم می‌شود. تا کنون ۱۶ هم‌گلوتینین (H1-H16) و ۱۰ نورامینیداز (N1-N۱۰) شناسایی شده‌اند که همگی در گونه‌های پرندگان یافت می‌شوند ولی تنها سه نوع هم‌گلوتینین (H1-H3) و دو نوع نورامینیداز (N1-N2) در انسان شناسایی شده‌اند (۱).

ویروس انفلوانزا توانایی ایجاد پاندمی در میان جوامع انسانی را دارا می‌باشد. عموم پژوهشگران بر این باور بودند که پاندمی زمانی به‌وجود می‌آید که ویروسی با زیر گونه‌ی جدید هم‌گلوتینین و نور آمینیداز و یا فقط با زیر گونه‌ی جدید هم‌گلوتینین به‌وجود بیاید و بتواند منجر به عفونت و بیماری در انسان شده و از فردی به فرد دیگر انتقال پیدا کند (۲). طی سه قرن اخیر ۱۰ پاندمی بزرگ اتفاق افتاده که سه مورد از این پاندمی‌ها در قرن بیستم در سال‌های (H1N1) ۱۹۱۸، (H2N2) ۱۹۵۷ و (H3N2) ۱۹۶۸ بوده است (۳).

نخستین پاندمی قرن بیست و یکم در سال ۲۰۰۹ با آغاز عفونت در مکزیک و انتشار آن طی چند ماه به بیشتر کشورهای دنیا با میزان مرگ و میر حدود یک درصد از مبتلایان به وقوع پیوست (۲). تا ماه مارس ۲۰۱۰

میلادی، یعنی پس از فقط یکسال، تقریباً همه کشورها گزارش‌هایی از شیوع این بیماری منتشر کردند و اولین گزارش از شیوع این ویروس در ایران در سال ۲۰۱۰ منتشر شده است (۴). این ویروس جدید که از بازآرایی ژنوم سه نوع ویروس انفلوانزای انسانی، خوک و پرندگان به وجود آمده است novelA/H1N1 (nA/H1N1) نامیده شد (۵-۷) و در حال حاضر به‌عنوان ویروس A/H1N1 پاندمیک شناخته می‌شود.

با توجه به نقش مهم هم‌گلوتینین در عفونت‌زایی ویروس انفلوانزا، تعیین توالی ژنی این پروتئین و بررسی تغییرات آن به‌منظور استفاده در تولید واکسن‌های مناسب با سویه‌های در حال گردش ضروری به‌نظر می‌رسد. در این مطالعه ژنوم کامل هم‌گلوتینین سویه nA/H1N1 پس از جداسازی از نمونه بالینی، در ناقل pGEM-T Easy کلون گردید و تعیین ترادف شد.

مواد و روش‌ها

ویروس

در این بررسی آزمایشگاهی به‌منظور جداسازی ژن کد کننده پروتئین هم‌گلوتینین، از نمونه‌های بالینی تأیید شده استفاده گردید. در پی بروز پاندمی ۲۰۰۹ و جهت بررسی شیوع ویروس جدید در کشور، در فاصله زمانی مرداد ماه ۱۳۸۸ تا شهریور ماه ۱۳۸۹، تعداد ۳۸۷ نمونه سوآب حلقی از بیماران مشکوک به انفلوانزا از شش استان کشور (با هماهنگی و مجوز مرکز مدیریت بیماری‌های وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی) در محیط ترانسپورت ویروسی جمع‌آوری و با حفظ زنجیره سرد به آزمایشگاه انفلوانزای انستیتو پاستور ایران ارسال گردید. نمونه‌ها پس از سانتریفیوژ و تقسیم شدن در فریزر -۷۶ درجه

سانتی‌گراد نگهداری شدند. وجود ویروس انفلوانزای nA/H1N1 در نمونه‌های بیماران با روش Real-time PCR و طبق پروتکل بین‌المللی (۸) مورد بررسی قرار گرفته و عیار ویروس در نمونه‌های مثبت با تست هم‌گلو تیناسیون تعیین شد.

پرایمرها

در این پژوهش برای جداسازی ژن کد کننده هم‌گلو تینین از پرایمرهای اختصاصی که توسط چان (Chan) و همکاران طراحی شده بود، استفاده گردید (۹). در دو انتهای قطعات ژنومی ویروس انفلوانزای تیپ A نواحی غیر ترجمه‌ای وجود دارد که در تمام زیرتیپ‌های این ویروس حفاظت شده و یکسان می‌باشد. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه که مترادف آن‌ها در ادامه آورده شده است، مکمل نوکلئوتیدهای ۱۲ تا ۳۲ قبل از کدون شروع و ۲۴ تا ۴۴ پس از کدون پایانی در نواحی غیرترجمه‌ای می‌باشند و محصول PCR دارای طول کامل ژن هم‌گلو تینین خواهد بود.

Uni-HA-F: 5'AGCAAAAGCAGGGGAAAAATA 3'
Uni-HA-R: 5'AGTAGAAACAAGGGTGTITT 3'

استخراج RNA

استخراج RNA از نمونه بیماران با استفاده از محلول TMeasy-RED (iNtRON, South Korea) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. به این ترتیب که ۲۵۰ میکرولیتر نمونه مورد آزمایش با ۷۵۰ میکرولیتر از محلول TMeasy-RED مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط قرار داده شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴۰°C سانتریفیوژ شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه شده و پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای محیط، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴۰°C سانتریفیوژ گردید. هم حجم RNA جمع‌آوری شده از لایه بالایی، ایزوپروپیل الکل افزوده و بعد از ۱۰

دقیقه انکوباسیون در دمای محیط، مجدداً در دمای ۴۰°C به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصله بعد از شستشو با اتانل ۷۰ درصد در آب تیمار شده با DEPC (Diethyl pyrocarbonate) حل گردید. در تمام مراحل فوق سانتریفیوژ با دور ۱۵۰۰^۱g می‌باشد.

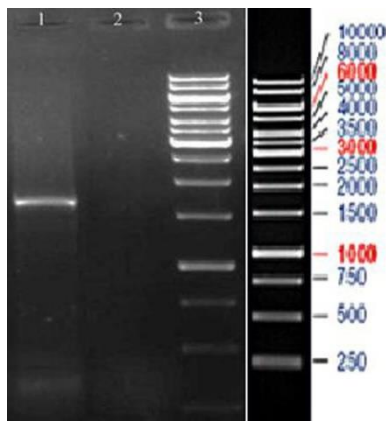
One step-RT-PCR

در این واکنش از RNA استخراج شده و آنزیم Superscript® III RT/platinum® Taq Mix طی یک مرحله جهت جداسازی ژن کد کننده هم‌گلو تینین استفاده شد. واکنش RT-PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (شرکت اپندورف مدل ۲۲۳۳۱) اجرا گردید و نتایج آن با روش ژل الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. جداسازی و تکثیر ژن فوق با غلظت‌های مختلف واکنش‌گرها (Primers, RNA, MgCl₂) و در گرادیان دمایی صورت گرفت. شرایط بهینه دمایی PCR انجام شده به شرح زیر می‌باشد: ۶۰ دقیقه در ۴۵°C، ۵ دقیقه در ۹۴°C، ۳۵ بار تکرار چرخه دمایی به صورت ۳۰ ثانیه در ۹۴°C، ۴۵ ثانیه در ۵۸°C، ۷ دقیقه در ۷۲°C و در پایان ۱۰ دقیقه در ۷۲°C.

کلونینگ ژن هم‌گلو تینین در ناقل pGEM-T Easy

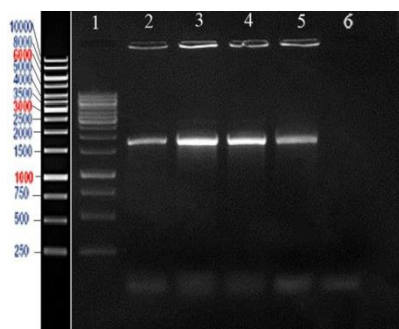
قطعه ژنوم کامل هم‌گلو تینین ویروس n AH1N1 که با روش PCR تکثیر شده بود با استفاده از کیت (کیاژن) از ژل استخراج و پس از اندازه‌گیری غلظت، با استفاده از آنزیم T4DNA ligase به وکتور pGEM-TEasy اتصال یافته (۱۰) و سپس درون باکتری (Novagen) E.coli Top10F' ترانسفورم گردید. باکتری فوق در محیط کشت جامد (LB (LouriaBertoni دارای آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین و آمپی‌سیلین کشت داده

و استفاده از آنزیم ذکر شده در این مطالعه، باند غیراختصاصی مشاهده نشد. نتیجه الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز در شکل ۱ آورده شده است.



شکل (۱) نتیجه حاصل از تکثیر ژنوم کامل هم‌گلوتینین به روش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (ستون ۱)، کنترل منفی PCR (ستون ۲)، مارکر اختصاصی (ستون ۳) ۱ Kbp (Fermentas SM0311) (ستون ۳).

ژن HA از ژل آگارز استخراج و سپس در وکتور pGEM-T Easy جای‌سازی گردید. پلاسمیدهای نوترکیب با پرایمرهای اختصاصی به روش PCR مورد بررسی قرار گرفته و تأیید شدند. محصول PCR که قطعه‌ای معادل ۱۷۷۷ جفت باز بود روی ژل آگارز مشاهده گردید. نتایج تأیید کلونینگ در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل (۲) نتیجه تأیید جای‌سازی ژن HA در T Easy-vector توسط PCR با پرایمرهای اختصاصی، ستون ۱ مارکر ۱ Kbp، از ستون ۲ تا ۵ محصولات PCR کلنی‌های سفید غریبال شده و ستون ۶ کنترل منفی

شد و با استفاده از روش غربالگری کلنی‌های آبی-سفید، کلنی‌های واجد پلاسمید مورد نظر انتخاب گردیدند و پلاسمید آن‌ها از کشت مایع شبانه و با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (iNTRON SouthKoria) جدا شد.

پلاسمیدهای نوترکیب از نظر وجود یا عدم وجود ژن مورد نظر ابتدا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی با روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند و سپس جهت تعیین توالی ارسال گردیدند (۱۱).

یافته‌ها

جداسازی و کلونینگ ژن HA

از ۳۸۷ نمونه ارسالی به این آزمایشگاه، ۱۴۵ نمونه از نظر انفلوانزای تیپ A مثبت بوده و از آن میان، ۹۳ نمونه واجد ویروس تحت تیپ Novel A/H1N1 بودند. نمونه‌های مثبت با آزمون هم‌گلوتیناسیون از نظر تیتراژ ویروس مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه از نمونه‌های بیمارانی که حداقل تیتراژ ویروسی در آن‌ها معادل ۸ واحد هم‌گلوتینین بود، استفاده شد. RNA نمونه‌های فوق استخراج و PCR انجام شد. جداسازی ژن هم‌گلوتینین فقط در نمونه‌ای که تیتراژ ویروس در آن معادل ۲۵۶ واحد بود، با موفقیت صورت گرفت.

برای تکثیر ژن از آنزیم‌های پلیمراز مختلف استفاده شد که در پایان با استفاده از آنزیم Superscript®III RT/platinum®Taq Mix نتیجه مطلوب حاصل شد. آنزیم فوق سنتز cDNA و تکثیر آن را به طور همزمان در یک واکنش امکان‌پذیر می‌سازد که این امر منجر به از بین رفتن احتمال کاهش غلظت cDNA در حین سنتز آن در واکنشی جداگانه، می‌گردد. در مقایسه با دیگر بررسی‌های مربوط به جداسازی ژن مورد نظر (۹ و ۱۲)، با توجه به بهینه‌سازی شرایط PCR

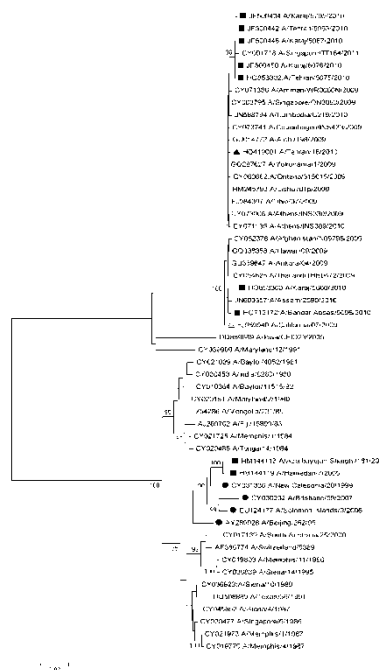
ناقلین نو ترکیب جهت تأیید نهایی تعیین ترادف شدند. آنالیز نتایج با استفاده از نرم افزار Chromas ویرایش صورت پذیرفت و با سایر سکانس های گزارش شده در سایت NCBI مقایسه گردید. یافته ها بیانگر آن بود که سکانس ژن همگلو تینین ویروس ایزوله ایران با سایر سکانس های ثبت شده، بیش از ۹۸ درصد شباهت دارد. ترادف نوکلئوتیدی نهایتاً در بانک ژن بین المللی با کد دستیابی "HQ۴۱۹۰۰۱/۱" ثبت گردید. این توالی با توالی ویروس به کار رفته در واکسن و ویروس های عامل پاندمی های قبلی از جمله H1N1 ۱۹۱۸ مقایسه شد و به صورت درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم افزار Mega4 رسم گردید که در شکل ۳ آورده شده است.

چرخش همزمان ویروس انفلوآنزای nA/H1N1
ویروس انفلوآنزای نوع A فصلی و ویروس انفلوآنزای
پرنده‌گان که هم اکنون در جهان در حال وقوع است،
خطر تغییرات و بازآرایی‌های ژنی جدید را زیاد
می‌کند و جامعه را در معرض خطر جدی قرار
می‌دهد (۱۳).

در مقابل انواع ویروسهای جدید، پادتن‌های مناسب در افراد جامعه وجود ندارد و احتمال شیوع سریع بیماری زیاد است (۱۴). گسترش و شیوع اپیدمی سال ۲۰۰۹ بر خلاف اپیدمی‌های قبلی، بسیار سریع اتفاق افتاد و همین امر موجب انجام تحقیقات بسیار گسترده و وسیع در مورد ویروس انفلوانزای nA/H1N1 گردید (۵).

از میان پروتئین‌های ویروس انفلوانزا هم‌اگلوتینین نقشی مهم و کلیدی در تولید واکسن انفلوانزا دارد. این پروتئین که به‌صورت برجستگی‌های قارچی شکل بر روی پوشش ویروس به‌مقدار فراوان وجود دارد، گلیکوپروتئینی غشایی می‌باشد که با اتصال به اسید سیالیک سطح غشا سلول‌های اپیتلیال موجود در مجرای تنفسی در اتصال ویروس به سلول‌های میزبان و آلوده نمودن سلول‌ها نقش مهمی دارد (۱۵ و ۱۶).

پروتئین هم‌گلوتینین ویروس انفلوانزای nA/H1N1
دچار جهش‌های ژنتیکی بسیار زیادی شده است و



شکل ۳) نتایج حاصل از بررسی فیلوژنتیکی توالی ژن همگلوکتینین ویرس n A/H1N1 جداییه ایران با روش neighbor joining با استفاده از نرم افزار Mega4▲ جداییه این مطالعه، Δ سویه پیشنهادی WHO جهت تولید واکسن n A/H1N1 ●، سویه های H1N1 واکسن های فصلی و ■ سایر جداییه های ایران. سایر توالی ها از بانک ژنی NCBI بدست آمده است.

همین امر یکی از دلایل فرار این ویروس از دست سیستم ایمنی میزبان بود و باعث شد که واکسن‌های فصلی نتوانند ایمنی کارآمدی در برابر این ویروس ایجاد کنند. از جمله این جهش‌ها که بیشتر در موارد منجر به مرگ دیده شده است، جهش در آمینو اسید موقعیت ۲۲۲ این پروتئین بوده (D222G) که منجر به جایگزینی گلیسین به جای اسید اسپارتیک می‌گردد (۱۷ و ۱۸).

به‌طور کلی ویروس انفلوانزا برای اتصال به سلول، دارای گیرنده‌ی اسید سیالیک می‌باشد که در بعضی از سویه‌ها مثل H5N1 گیرنده‌ی ۲۵-۳ وجود دارد که موجب اتصال ویروس به قسمت تحتانی دستگاه تنفسی می‌شود و در برخی دیگر مانند سویه‌ی H1N1 گیرنده‌ی ۲۵-۶ موجب اتصال ویروس به قسمت فوقانی دستگاه تنفسی می‌شود ولی سویه‌ی n A/H1N1 در اثر جهش D222G دارای ترکیبی از هر دو گیرنده می‌باشد که همین امر تأثیر بسزایی در شدت بیماری ایجاد شده دارد. جهش مرگبار D222G در جدایه این بررسی مشاهده نشد، اگر چه از سرنوشت بیماری که نمونه از آن جدا شده اطلاعی در دست نیست.

از موارد دیگر می‌توان به تغییر در میزان دنباله‌های قندی هماگلوتینین ویروس nA/H1N1 اشاره کرد، به‌گونه‌ای که گلیکوزیله شدن این پروتئین بسیار شبیه به ویروس انفلوانزای ۱۹۱۸ و ویروس انفلوانزایی است که در قبل از سال ۱۹۴۰ رواج داشته است.

بررسی‌های انجام شده در این مطالعه و سایر پژوهش‌های انجام شده، کاهش میزان گلیکوزیله شدن را نشان داده‌اند (۱۹). جدایه این بررسی، سویه ۱۹۱۸ و سویه‌های فصلی با استفاده از پایگاه‌های اطلاع رسانی از نظر مکان‌های با قابلیت

گلیکوزیلاسیون (NXS/T) مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی‌ها نشان داد که جدایه این مطالعه مشابه عامل پاندمی مرگبار ۱۹۱۸ واجد ۴ مکان بالقوه گلیکوزیلاسیون بوده در حالی که سویه‌های فصلی از جمله سویه Newcaledonia واجد ۶ مکان گلیکوزیلاسیون می‌باشند. بررسی‌ها نشان داد موتاسیون‌هایی در ژن HA منجر به جابجایی آسپارژین به لیزین در موقعیت ۷۱ و ۱۷۶ گردیده و سبب از دست رفتن دو سایت با قابلیت گلیکوزیلاسیون شده است. یکی از اپی‌توپ‌های تحریک کننده سلول‌های B در مجاورت سایت گلیکوزیلاسیون در موقعیت ۱۷۶ قرار دارد.

مطالعات نشان داده است گلیکوزیلاسیون مولکول هماگلوتینین برای تاخوردگی صحیح مولکول و ایجاد جایگاه‌های آنتی‌ژنیک امری ضروری است. گرچه این گلیکان‌ها ممکن است باعث پوشاندن سایت‌های آنتی‌ژنیک مولکول گردند به نحوی که سیستم ایمنی به‌خوبی نتواند بر علیه آن‌ها فعال شود. احتمالاً یکی از دلایل انتشار سریع سویه جدید انفلوانزا و ناکارآمدی واکسن‌های قبلی، جهش‌هایی است که در ساختار هماگلوتینین رخ داده و منجر به حذف برخی از جایگاه‌های گلیکوزیلاسیون گردیده است. به عبارت دیگر سایت‌هایی در معرض قرار می‌گیرند که بر علیه آن‌ها خطر ایمنی وجود ندارد. بنابراین سبب گسترش سریع ویروس می‌گردد. یافته‌های یک بررسی که در فنلاند انجام شد، نشان داده است که در سرم ۹۶ درصد افراد مسن بر علیه این ویروس جدید آنتی‌بادی وجود داشته است که نشان‌دهنده شباهت این ویروس با ویروس ۱۹۱۸ و وجود سلول‌های خاطره ایمنی در این افراد می‌باشد. در حالی که ایمنی حاصل از واکسن‌های فصلی در

نتیجه‌گیری

در این مطالعه ژن هم‌اگلوتینین و ویروس novel A/H1N1 جدایه ایران با موفقیت جداسازی و تعیین توالی گردید. با استفاده از ژن فوق می‌توان پروتئین هم‌اگلوتینین را در سیستم‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی به‌صورت نوترکیب تولید کرد. هم‌اگلوتینین نوترکیب پروکاریوتی که به‌صورت صنعتی به راحتی قابل تولید است، جهت استفاده در آزمون‌های تشخیصی کاربرد دارد و از پروتئین تولید شده در سیستم‌های یوکاریوتی به‌واسطه انجام فرآیندهای پس ترجمه‌ای مشابه با میزبان اصلی، می‌توان به‌عنوان واکسن زیر واحدی انفلوآنزای nA/H1N1 بهره‌برداری کرد.

سپاس و قدردانی

بدین‌وسیله از تمامی همکاران آزمایشگاه تحقیقات انفلوآنزا که ما را در انجام این تحقیق یاری رساندند، تقدیر و تشکر می‌گردد.

کودکان و بالغین جوان، نتوانست مانع از بروز پاندمی فوق‌گردد (۲۰).

پژوهش‌ها نشان داده است که ویروس جدید از نظر آنتی‌ژنیکی هم‌وزنوس می‌باشد. به‌گونه‌ای که توالی ژن هم‌اگلوتینین سویه جدا شده در کالیفرنیا (A/California/7/2009) که به‌عنوان سویه واکسن ویروس پاندمی مورد استفاده قرار می‌گیرد، تقریباً با تمام توالی‌های گزارش شده از سراسر دنیا مطابقت دارد (۵). یافته‌های آنالیز نوکلئوتیدی در این مطالعه که به‌صورت درخت فیلوژنتیک در شکل ۳ آورده شده است، مشابه یافته‌های سایرین نشان داد که ترادف فوق با سایر توالی‌های ثبت شده در بانک ژن بیش از ۹۸ درصد تشابه دارد. همان‌گونه که در شکل ۳ مشخص است، سویه جدا شده این مطالعه با سویه پیشنهادی WHO جهت تولید واکسن n A/H1N1 و سایر سویه‌های جدا شده سال‌های اخیر ایران شباهت بالایی داشته و با سویه‌های واکسن‌های فصلی و سویه‌های سال‌های گذشته ایران تفاوت بارزی دارد.

References:

1. Cox RJ, Brokstad KA, Ogra P. Influenza Virus: Immunity and Vaccination Strategies. Comparison of the Immune Response to Inactivated and Live, Attenuated Influenza Vaccines. *Scand J Immunol* 2004; 59(1): 1-15.
2. Peiris JS, Tu WW, Yen HL. A novel H1N1 virus causes the first pandemic of the 21st century. *Eur J Immunol* 2009; 39(11): 2946-54.
3. Nguyen-van-Tam JS, Hampson AW. The epidemiology and clinical impact of pandemic influenza. *Vaccine* 2003; 21(16): 1762-8.
4. Gooya MM, Soroush M, Mokhtari-Azad T, et al. Influenza A (H1N1) pandemic in Iran: report of first confirmed cases from June to November 2009. *Arch Iran Med* 2010; 13(2): 91-8.
5. Kang X, Li Y, Sun H, et al. Subtype identification of the novel A H1N1 and other human influenza A viruses using an oligonucleotide microarray. *Arch Virol* 2010; 155(1): 55-61.
6. Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 2009; 459(7250): 1122-5.
7. Trifonov V, Khiabani H, Greenbaum B, et al. The origin of the recent swine influenza A (H1N1) virus infecting humans. *Euro surveill* 2009; 14(17): pii:1993.
8. CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A(H1N1). (Accessed April 28, 2009, at http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCrealtimeRTPCRprotocol_20090428.pdf.)
9. Chan CH, Lin KL, Chan Y, et al. Amplification of the entire genome of influenza A virus H1N1 and H3N2 subtypes by revers-transcription polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 2006; 136(1-2): 38-43.

10. Promega Technical Manual. pGEM-T and pGEM-TEasy vector systems. (Accessed November 5, 2007, at <http://www.promega.ro/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems>.)
11. Sambrook J, Russell DW, editors. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory press: 2001.
12. Hoffmann E, Stech J, Guan Y, et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. Arch Virol 2001;146(12): 2275-89.
13. Stein RA. Lessons from outbreaks of H1N1 Influenza. Ann Intern Med 2009; 151(1): 59-62.
14. World Health Organization. Influenza A(H1N1). (Accessed June 3, 2009, at http://www.who.int/csr/don/2009_06_03/en/index.html.)
15. Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. Annu rev biochem 2000; 69: 531-69.
16. Xu R, Ekiert DC, Krause JC, et al. Structural basis of preexisting immunity to the 2009 H1N1 pandemic influenza virus. Science 2010; 328(5976): 357-60.
17. Kilander A, Rykkvin R, Dudman SG, et al. Observed association between the HA1 mutation D222G in the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus and severe clinical outcome, Norway 2009-2010. Euro Surveill 2010; 15(9): pii:19498.
18. Chutinimitkul S, Herfst S, Steel J, et al. Virulence-associated substitution D222G in the hemagglutinin of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus affects receptor binding. J Virol 2010; 84(22): 11802-13.
19. Reichert T, Chowell G, Nishiura H, et al. Does Glycosylation as a modifier of Original Antigenic Sin explain the case age distribution and unusual toxicity in pandemic novel H1N1 influenza? BMC Infect Dis 2010; 10: 5.
20. Ikonen N, Strengell M, Kinnunen L, et al. High frequency of cross-reacting antibodies against 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus among the elderly in Finland. Euro Surveill 2010; 15(5): pii:19478.

Original Article

Isolation and sequence analysis of hemagglutinin gene of Influenza A H1N1 virus from Iranian clinical samples during 2009 pandemic flu

SF. Mousavi¹, F. Fotouhi^{1*}, A. Yousefi¹, B. Frarahmand¹,
B. Heydarchi¹, R. Tavakoli¹, M. Tavassoti Kheiri¹

¹ Department of Virology, Influenza Research Lab, Pasteur Institute of Iran, Tehran, IRAN

(Received 15 Aug, 2012 Accepted 13 Oct, 2012)

Abstract

Background: Influenza virus is a globally important respiratory pathogen causing high degree of morbidity and mortality annually. The novel Influenza virus (A/H1N1) which involved many populations of the world in 2009 is a sort of triple reassortment between swine, bird and human viruses. Given the important role of hemagglutinin in the infectivity of influenza virus, genome sequencing of this protein and investigation of its changes seems necessary.

Material and Method: In this experimental study, the viral genome was extracted from clinical throat swab samples, in which the presence of swine influenza genome has been confirmed by Real-time PCR according to WHO protocol in Influenza Research Lab, Pasteur Institute of Iran. Full-length of HA genome was amplified using specific primers by one step-RT-PCR, cloned into pGEM-T Easy vector followed by identification with restriction enzyme analysis and sequencing.

Results: Full genome of novel influenza A/H1N1 from clinical samples was amplified by PCR and the expected 1777 bp segment PCR product was visualized by electrophoresis, gel purified, cloned into pGEM-TEasy vector and then sequenced. Analysis of sequencing was accomplished by chromas software (version 1.45-Australia) and the nucleotide sequence data was deposited in GenBank database under the accession number: "HQ419001.1".

Conclusion: The result of sequencing was well-matched with the recommended vaccine strain and other registered sequences in NCBI.

Key Words: Influenza A, Hemagglutinin, Pandemic Flu 2009, sequencing, gene bank

*Address for correspondence: Pasteur Institute of Iran, NO.358, 12th Farvardin Ave, Jomhuri Street, Tehran, IRAN, Postal code: 1316943551; E-mail: fotouhi@pasteur.ac.ir